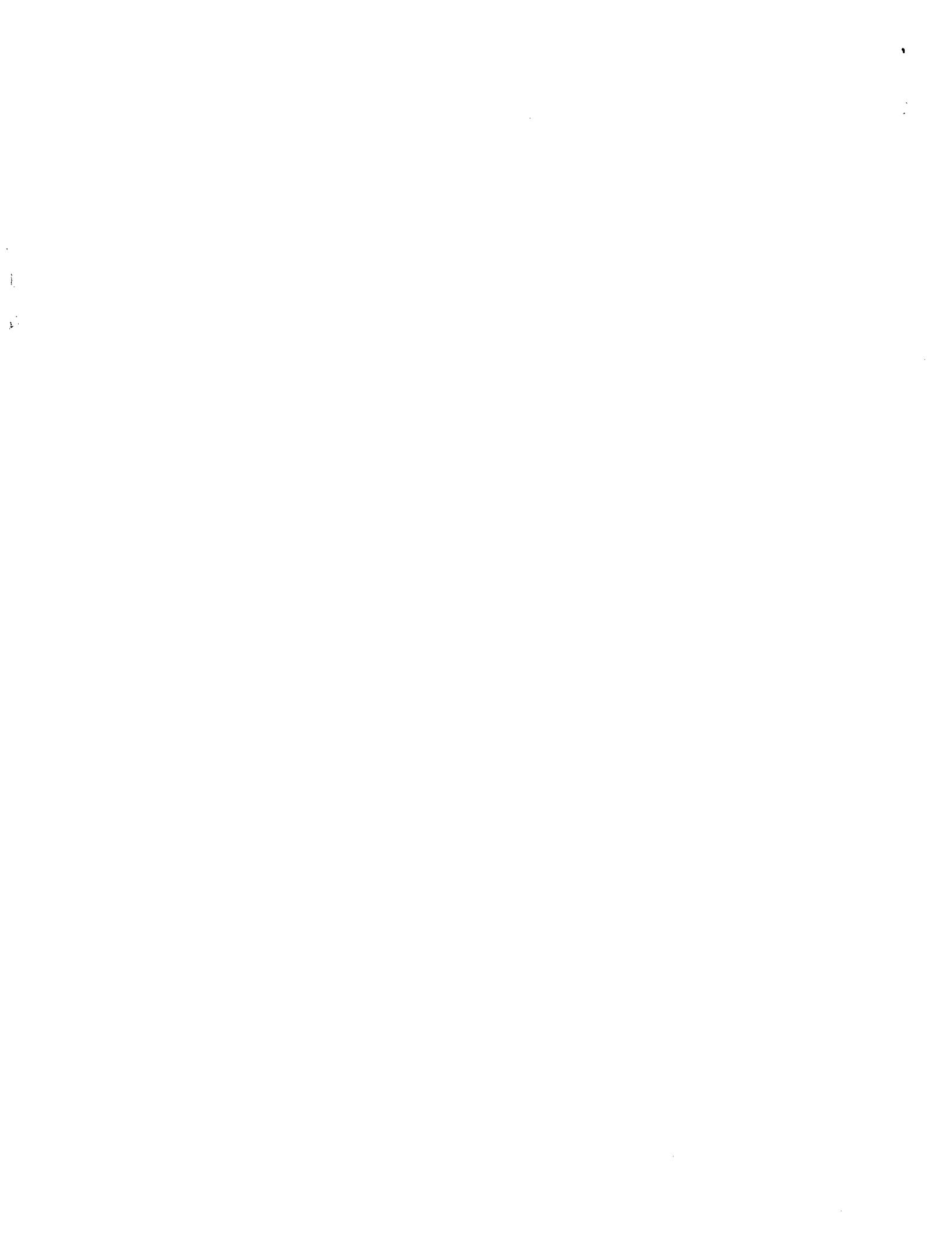


BIOLOGICAL PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATE CONTAINING AROMATIC COMPOUND AS SUBSTRATE**Patent number:** JP2000166586**Publication date:** 2000-06-20**Inventor:** IMAMURA TAKESHI; KAWABATA YUJI**Applicant:** CANON INC**Classification:**- **international:** C12P7/62- **europen:****Application number:** JP19980344507 19981203**Priority number(s):****Abstract of JP2000166586**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a polyhydroxyalkanoate having biodegradability by culturing a microorganism capable of assimilating an aromatic compound and producing and accumulating a polyhydroxyalkanoate in a culture medium containing an aromatic compound having benzene nucleus.

SOLUTION: A microorganism having ability capable of assimilating an aromatic compound having benzene nucleus, e.g. benzene, toluene, xylene, ethylbenzene, phenol or cresol and producing and accumulating a polyhydroxyalkanoate (e.g. *Barkholderia acepacia* KK01 strain (FERM BP-4235)) in the aromatic compound to provide the objective polyhydroxyalkanoate having characteristics capable of being degraded by an organism, free from production of harmful substances such as dioxin or environmental hormone, not causing environmental pollution, enabling environmental protection and useful as a plastic.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-166586

(P2000-166586A)

(43)公開日 平成12年6月20日 (2000.6.20)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード(参考)

C 12 P 7/62

C 12 P 7/62

4 B 0 6 4

// (C 12 P 7/62

C 12 R 1:01)

(C 12 P 7/62

C 12 R 1:05)

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁)

(21)出願番号

特願平10-344507

(22)出願日

平成10年12月3日 (1998.12.3)

(71)出願人 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(72)発明者 今村 剛士

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(72)発明者 川畠 祐司

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

(74)代理人 100088328

弁理士 金田 輝之 (外2名)

F ターム(参考) 4B064 AD83 BA16 CA02 CC03 CD04
CD06 DA16

(54)【発明の名称】 芳香族化合物を基質とするポリヒドロキシアルカノエートの生物的生産方法

(57)【要約】

【課題】 芳香族化合物を原料としてポリヒドロキシアルカノエートを微生物により生産できる方法を提供すること。

【解決手段】 芳香族化合物を資化し且つポリヒドロキシアルカノエートを生産・蓄積する能力を有する微生物を、芳香族化合物を含む培地で培養する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ベンゼン核を有する芳香族化合物を含む培地中で、該芳香族化合物を資化し且つポリヒドロキシアルカノエートを生産・蓄積する能力を有する微生物を培養する工程を有することを特徴とするポリヒドロキシアルカノエートの製造方法。

【請求項2】 該芳香族化合物がベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、フェノール及びクレゾールからなる群から選択された一つ以上である請求項1に記載の製造方法。

【請求項3】 該微生物が、バーグホルデリア(Burkholderia)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属またはラルストニア(Ralstonia)属に属する細菌である請求項1に記載の製造方法。

【請求項4】 該微生物が、バーグホルデリア・セバシア(Burkholderia cepacia)KK01株 (FERM BP-4235)、アルカリゲネス・スピーシズ(Alcaligenes sp.)TL2株 (FERM P-14642) またはラルストニア・ユウトロファ(Ralstonia eutropha)TB64株(FERM P-16980)である請求項3に記載の製造方法。

【請求項5】 該ポリヒドロキシアルカノエートが、モノマーユニットとして3-ヒドロキシブチレートを含む請求項1に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、3-ヒドロキシブチレートをモノマーユニットとして含むポリヒドロキシアルカノエートの微生物を用いた製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 ポリ3-ヒドロキシブチレート(PHB)に代表される微生物産生ポリエステルは、石油由来の合成高分子とは異なり、生物により分解されうるという特性を有している。人類は長年にわたって合成高分子をプラスチック等として使用してきたが、それらのプラスチックが廃棄物となった場合、その分解されにくいという性質が災いし、廃棄物処理場に蓄積される。また、焼却処理を行うことにより、ダイオキシンや環境ホルモン等の有害物質の原因となり、環境汚染を引き起こすことが問題となっている。一方、微生物産生ポリエステルは生分解されることにより自然の物質循環に取り込まれるので、環境保全を可能とするプラスチックとして利用することができる。また、医療用軟質部材としても今後有用視される可能性を有している(特開平5-159号公報)。これまで、多くの細菌がPHB或いはその他のアルカノエートとのコポリマーを菌体内に生成・蓄積することが報告されてきた(「生分解性プラスチックハンドブック」(生分解性プラスチック研究会編: (株)エヌ・ティー・エス), p17-8-197, 1995年5月26日発行)。特に、アルカリゲネス・ユウトロファスH16株 (Alcaligenes eutrophus H16, ATCC No. 17699) 及びその変異株については、こ

れらポリマーの生産に関して詳細に研究されてきており、基質となる炭素源を変化させることによって、この株が3-ヒドロキシブチレート(3HB)と3-ヒドロキシバーレート(3HV)の共重合体または両者の各単位を共に含有成分とする共重合体を様々な割合で生成することが開示されている(特公平6-15604号公報、特公平7-14352号公報、特公平8-19227号公報等)。

【0003】 特許第2642937号公報には、シュードモナス・オレオボランス(*Pseudomonas oleovorans*) ATCC29347株に、炭素源として非環状脂肪族炭化水素を与えることにより、炭素数が6から12までの3-ヒドロキシアルカノエート(3HA)をモノマーユニットとするポリエステルが生産されることが開示されている。特開平5-74492号公報には、メチロバクテリウム(*Methylobacterium*)属、パラコッカス(*Paracoccus*)属、アルカリゲネス属、シュードモナス属の細菌を、炭素数3から7の第一アルコールに接触させることにより、これらの細菌に3HBと3HVの共重合ポリエステルを生産させる方法が開示されている。特開平5-93049号公報、及び特開平7-265065号公報には、アエロモナス・キャビエ(*Aeromonas caviae*)をオレイン酸やオリーブオイルを炭素源として培養することにより3HBと3-ヒドロキシヘキサノエート(3HHx)の2成分共重合ポリエステルが生産されることが開示されている。特開平9-191893号公報には、コマモナス・アシドボランス(*Comamonas acidovorans*) IF013852株を炭素源としてグルコン酸及び1,4ブタンジオールを用いた培養により、3HBと4-ヒドロキシブチレート(4HB)をモノマーユニットに持つポリエステルが生産されることが開示されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 このように、従来の微生物生産ポリエステルであるポリヒドロキシアルカノエート(PHA)を生産せしめる場合の炭素源は、糖、脂肪族炭化水素、脂肪酸、アルコール等であり、広範囲な条件においてPHAを生産せしめるという観点からすると、用いる得る炭素源の範囲を広げることが重要となってくる。更に、廃棄物や環境を汚染している物質を単廻源として用いることができれば、廃棄物処理や環境浄化を行う一つ、環境にやさしい生分解性のPHAを生産することができる。

【0005】 本発明の目的は、芳香族化合物を炭素源としてPHAを生産できる微生物を用いることで、PHA生産用の原料として芳香族化合物の利用を可能とすることにある。本発明の他の目的は、産業廃棄物や汚染された環境から供給される芳香族化合物を原料としてPHAを生産することで、産業廃棄物処理や環境浄化処理を行うとともに、PHAを生産できる方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は上記の様な問題

点を解決するための方法を提供するものである。即ち、本発明のポリヒドロキシアルカノエート (PHA) の製造方法は、ベンゼン核を有する芳香族化合物を含む培地中に、該芳香族化合物を資化し且つポリヒドロキシアルカノエートを生産・蓄積する能力を有する微生物を培養することを特徴とする。

【0007】本発明において用い得る芳香族化合物としては、ベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、フェノール及びクレゾールが挙げられ、これらのうちのいずれか一つ以上を用いることができる。これらの化合物は、化学系工場の産業廃液等に多く含まれ、その処理が問題となっており、これらの化合物をPHA生産のための炭素源として用いることにより、廃液処理を行うという効果も得られる。

【0008】シュードモナス・オレオボランスが、芳香核を含む化合物である5-フェニルバレリン酸を基質としてPHAを生産する報告がなされているが(Macromolecules, 24, 5256-5260 (1991))、この化合物はアセチルCoAにまでは分解されず、単に部分的に変換されて、ポリ β -ヒドロキシ5-フェニルバレリン酸となる。

【0009】それに対し本発明における方法は、ベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、フェノール、クレゾールといった芳香族化合物を基質とし、最終的に大部分の3HBと少量の4HB、3HVをモノマーエニットとするPHAを生産するので、該芳香族化合物はアセチルCoAにまで分解されてPHAが合成されていると考えられる。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明で用いる微生物としては、上記芳香族化合物を資化しうる微生物であり且つ菌体内でPHAを生産・蓄積することができる微生物であればいかなる微生物でもよく、例えば、バーカルホルデリア(Burkholderia)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、アルカリゲネス(Alcaligenes)属、ラルストニア(Ralstonia)属、コマモナス(Comamonas)属にする細菌等が挙げられる。これらの細菌は、必要に応じて本発明の効果を損なわない範囲内でその2種以上を混合して用いることができる。

【0011】好ましい細菌としては、バーカルホルデリア・セバシア(Burkholderia cepacia)KK01株(FERM BP-4235)、アルカリゲネス スピーシズ(Alcaligenes sp.)TL2株(FERM P-14642)、ラルストニア・ユウトロファ(Ralstonia eutrophica)TB64株(FERM P-16980)を挙げることができる。

【0012】バーカルホルデリア・セバシア(Burkholderia cepacia)KK01株は、通産省、工業技術院、生命工学工業技術研究所にブダペスト条約下の国際寄託として寄託されている(寄託日: 平成4年3月11日、受託番号は上記のとおり)。なお、寄託当初はシュードモナス(Pseudomonas)属に属するものとされたが、その後尚、シュ

ードモナス・セバシアの分類学上の位置のバーカルホルデリア・セバシアへの変更にともなって、ここではKK01株をバーカルホルデリア属に属するものとして記載するが、寄託されている株自体に変更はない。

【0013】このKK01株は特公平8-24589号公報においてフェノール、クレゾール等の芳香族化合物を分解する菌として公告された菌株である。また、特開平6-296711号公報において、このKK01株がフェノール等の芳香族化合物を誘導物質としてTCE等の有機塩素化合物を分解することが開示されている。

【0014】アルカリゲネス スピーシズTL2株(通産省、工業技術院、生命工学工業技術研究所、寄託番号: FERM P-14642、寄託日: 平成6年11月15日)は、特開平8-154669号公報において、フェノール等の芳香族化合物を資化し、かつこれらの化合物を誘導物質としてTCE等の有機塩素化合物を分解することが開示されたものである。

【0015】ラルストニア・ユウトロファTB64株(通産省、工業技術院、生命工学工業技術研究所、寄託番号: FERM P-16980、寄託日: 平成10年9月3日)は、以下のような特徴を示す微生物である。なお、以下においては試験項目、結果の順に記載する。

【0016】(1) 形態観察

細胞の形: 桿菌 (0.3~0.5×1.0~2.0 mm)

胞子: 無

鞭毛: 有(周鞭毛)

グラム染色性

- ・18時間: 陰性
- ・24時間: 陰性
- ・36時間: 陰性

【0017】(2) 生理・生化学試験

嫌気下での生育: 陰性

カタラーゼ: 陽性

オキシダーゼ: 陽性

リトマスミルク: アルカリ

硝酸塩の還元: 陰性

V-P反応: 陰性

V-P培地のpH: 7.76

カゼインの分解: 陰性

ゼラチンの分解: 陰性

澱粉の分解: 陰性

DNAの分解: 陰性

尿素の分解: 陰性

Tween20の分解: 陰性

Tween40の分解: 陰性

Tween60の分解: 陰性

Tween80の分解: 陰性

チロシンの分解: 陽性

有機酸の利用

・クエン酸: 陽性

・フロヒオン酸：陽性

・酢酸：陽性

・フマル酸：陽性

・L-リンゴ酸：陽性

・コハク酸：陽性

無機窒素源の利用

・アンモニウム塩：陽性

・硝酸塩：陽性

インドールの生成：陰性

硫化水素の生成：陰性

色素の生成

・P agar : 陰性

・F agar : 陰性

・King A agar : 陰性

・King B agar : 陰性

NaCl存在下での生育

・2% : 陽性

・5% : 陰性

・7% : 陰性

生育pH : 5.0~9.0

生育温度 : 10°C~40°C

0.02%アジ化ナトリウム存在下での生育：陰性

0.001%リゾチウム存在下での生育：陽性

OFテスト：陰性

糖からの酸の生成

・グルコース：陰性

・アラビノース：陰性

・フラクトース：陰性

・ガラクトース：陰性

・マルトース：陰性

・ラクトース：陰性

・シュークロース：陰性

・キシロース：陰性

・トレハロース：陰性

・グリセロール：陰性

・マンニトール：陰性

・ソルビトール：陰性

・ソルボース：陰性

・マンノース：陰性

・ラムノース：陰性

・アドニトール：陰性

ガスの生成

・グルコース：陰性

・アラビノース：陰性

・キシロース：陰性

・マンニトール：陰性

【0018】(3) キノン組成分析

【表1】

キノン分子種	組成比 (%)
ユビキノン-8	95.4

【0019】以上の様な結果より、本菌株はラルストニア・ユウトロファ(Ralstonia eutropha)と同定するのが適当とした。

【0020】本発明における芳香族化合物を原料としたPHAの生産では、芳香族化合物を唯一の炭素源として与えてもよいし、これに酵母エキス、ポリペプトン等の増殖基質を併用してもよい。培養方法としては、バッチ式、流動バッチ式、連続培養式、リアクター形式等、通常微生物を培養するいかなる方法をも用いることができる。与える芳香族化合物の濃度は、一回に与える濃度として2mMから5mM程度とし、何回にもわたって添加して原料として利用させるようにしてもよい。PHAを生産・蓄積せしめる段階では、窒素源は枯渇常態にあるような条件に設定する事が望ましい。

【0021】本発明においては、少なくとも芳香族化合物を炭素源とし、これを例えれば無機塩培地に添加してPHA生産用の培地として利用することができる。この無機塩培地としては、リン源(通常はリン酸塩)、窒素源(通常はアンモニウム塩、或いは硝酸塩)等、微生物が増殖しうる成分を含んでいるものならいかなるものでもよく、例ええば、MSB培地、M9培地等を挙げができる。なお、M9培地の組成を以下に示す。

【0022】

Na₂HPo₄ : 6.2g

KH₂PO₄ : 3.0g

NaCl : 0.5g

NH₄Cl : 1.0g (培地1リットル中; pH7.0)

【0023】本発明における菌体からのPHAの回収は、通常行われているクロロホルム抽出が最も簡便であるが、有機溶媒が使用しにくい環境中においては、SDS等の界面活性剤処理、リゾチーム等の酵素処理、EDTA、次亜塩素酸ナトリウム、アンモニア等の薬剤処理によってPHA以外の菌体内成分を除去することによってPHAのみを回収する方法を探ることもできる。

【0024】

【実施例】以下に実施例などを示すが本発明は以下の実施例によって何等制限されうるものではない。

【0025】実施例1 (KK01株を用いたフェノールによるPHBの生産)

酵母エキス0.2%を含むM9寒天培地上のKK01株のコロニーを、酵母エキス0.1%、フェノール2mMを含むM9液体培地に植菌し、30°Cで培養した。24時間後、2mlの培養液をフェノール5mMを唯一の炭素源として含む200mlのM9液体培地中に加え、30°Cで培養した。培養中、18時間後、28時間後、38時間後、48時間後にフェノールを培地中

の濃度として $5\mu\text{M}$ になるように追加し、72時間後に遠心分離によって菌体を集菌した。この時、培地中のフェノール濃度を4-アミノアンチピリンを用いた吸光光度法 (JIS K 0102-1993 28.1) によって測定したところ、 $5\mu\text{M}$ 以下であった。

【0026】集菌したKK01株のペレットを凍結乾燥したところ、 210mg であった。この凍結乾燥ペレットを 100ml のクロロホルムに懸濁し、 60°C で20時間攪拌抽出した。抽出液をろ過した後、エバポレーターで濃縮し、濃縮液を冷ヘキサン中で再沈殿させ、ポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、 78mg であった。乾燥菌体当たりの量比は約37%ということになる。

【0027】得られたポリマーの組成は以下のようにして分析した。すなわち、ポリマー 10mg を 25ml 容ナス型フラスコに入れ、クロロホルム 2ml に溶解させ、3%硫酸を含むメタノール溶液 2ml を加えて、 100°C で還流しながら3.5時間反応させた。反応終了後、水 2ml を加えて激しく10分間振とうした後に、2層に分離した下層のクロロホルム層を取り出し、このクロロホルム層をガスクロマトグラフィーにかけて、各ヒドロキシアルカン酸メチルのピークのリテンションタイムと比較してモノマーユニットを同定した。その結果、3HBが98%、4HBが2%のポリエステルであることが判明した。

【0028】更に、GPCによってこのポリエステルの分子量を測定したところ、数平均分子量(M_n)が 280000 、重量平均分子量(M_w)が 1300000 であった。

【0029】実施例2 (TL2株を用いたフェノールによるPHBの生産)

酵母エキス0.2%を含むM9寒天培地上のTL2株のコロニーを、酵母エキス0.1%、フェノール 2mM を含むM9液体培地に植菌し、 30°C で培養した。20時間後、 2ml の培養液をフェノール 4mM を唯一の炭素源として含む 200ml のM9液体培地中に加え、 30°C で培養した。培養中、16時間後、24時間後、32時間後、40時間後、48時間後、60時間後にフェノールを培地中の濃度として 4mM になるように追加し、72時間後に遠心分離によって菌体を集菌した。この時、培地中のフェノール濃度を4-アミノアンチピリンを用いた吸光光度法 (JIS K 0102-1993 28.1) によって測定したところ、 $5\mu\text{M}$ 以下であった。

【0030】集菌したTL2株のペレットを凍結乾燥したところ、 290mg であった。この凍結乾燥ペレットから、実施例1と同様の方法でポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、 144mg であった。乾燥菌体当たりの量比は約50%ということになる。

【0031】得られたポリマーの組成を、実施例1と同様の方法で分析したところ、3HBが94%、4HBが6%のポリエステルであることが判明した。更に、GPCによってその分子量を測定したところ、数平均分子量(M_n)が 30000 、重量平均分子量(M_w)が 1100000 であった。

【0032】実施例3 (TB64株を用いたフェノールによるPHBの生産)

酵母エキス0.2%を含むM9寒天培地上のTB64株のコロニーを、酵母エキス0.1%、フェノール 2mM を含むM9液体培地に植菌し、 30°C で培養した。20時間後、 2ml の培養液をフェノール 4mM を唯一の炭素源として含む 200ml のM9液体培地中に加え、 30°C で培養した。培養中、16時間後、24時間後、32時間後、40時間後、48時間後、60時間後にフェノールを培地中の濃度として 4mM になるように追加し、72時間後に遠心分離によって菌体を集菌した。この時、培地中のフェノール濃度を4-アミノアンチピリンを用いた吸光光度法 (JIS K 0102-1993 28.1) によって測定したところ、 $5\mu\text{M}$ 以下であった。

【0033】集菌したTB64株のペレットを凍結乾燥したところ、 265mg であった。この凍結乾燥ペレットから、実施例1と同様の方法でポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、 119mg であった。乾燥菌体当たりの量比は約45%ということになる。

【0034】得られたポリマーの組成を、実施例1と同様の方法で分析したところ、3HBが95%、4HBが5%のポリエステルであることが判明した。更に、GPCによってその分子量を測定したところ、数平均分子量(M_n)が 26000 、重量平均分子量(M_w)が 990000 であった。

【0035】実施例4 (KK01株を用いたo-クレゾールによるPHBの生産)

酵母エキス0.2%を含むM9寒天培地上のKK01株のコロニーを、酵母エキス0.1%、o-クレゾール 2mM を含むM9液体培地に植菌し、 30°C で培養した。24時間後、 2ml の培養液をo-クレゾール 5mM を唯一の炭素源として含む 200ml のM9液体培地中に加え、 30°C で培養した。培養中、16時間後、26時間後、36時間後、46時間後、56時間後、66時間後にフェノールを培地中の濃度として 5mM になるように追加し、76時間後に遠心分離によって菌体を集菌した。この時、培地中のo-クレゾール濃度をp-ヒドロジノベンゼンスルホン酸を用いた吸光光度法 (JIS K 0102-1993 28.2) によって測定したところ、 $5\mu\text{M}$ 以下であった。

【0036】集菌したKK01株のペレットを凍結乾燥したところ、 255mg であった。この凍結乾燥ペレットから、実施例1と同様の方法によりポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、 98mg であった。乾燥菌体当たりの量比は約38%ということになる。得られたポリマーの組成を実施例1と同様の方法で分析した結果、3HBが97%、4HBが3%のポリエステルであることが判明した。

【0037】更に、GPCによってその分子量を測定したところ、数平均分子量(M_n)が 270000 、重量平均分子量(M_w)が 1200000 であった。

【0038】実施例5 (TB64株を用いたトルエンによるPHBの生産)

酵母エキス0.2%を含むM9寒天培地上のTB64株のコロニー

一を、酵母エキス0.1%、トルエン2mMを含むM9液体培地に植菌し、密栓して30°Cで培養した。24時間後、2mlの培養液をトルエン2mMを唯一の炭素源として含む200mlのM9液体培地中に加え、密栓して30°Cで培養した。培養中、20時間後、30時間後、40時間後、50時間後、60時間後、70時間後にトルエンを培地中の濃度として2mMになるように追加し、80時間後に遠心分離によって菌体を集菌した。この時、培地中のトルエンの濃度をガスクロマトグラフィーによって測定したところ、10μM以下であった。

【0039】集菌したTB64株のペレットを凍結乾燥したところ、188mgであった。この凍結乾燥ペレットから、実施例1と同様の方法でポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、79mgであった。乾燥菌体当たりの量比は約42%ということになる。

【0040】得られたポリマーの組成を、実施例1と同様の方法で分析したところ、3HBが96%、4HBが4%のポリエステルであることが判明した。また、3HVに相当するピークがトレースで確認された。更に、GPCによってその分子量を測定したところ、数平均分子量(Mn)が25000、重量平均分子量(Mw)が980000であった。

【0041】実施例6 (TL2株を用いたベンゼンによるPHBの生産)

酵母エキス0.2%を含むM9寒天培地上のTL2株のコロニーを、酵母エキス0.1%、ベンゼン2mMを含むM9液体培地に植菌し、30°Cで培養した。24時間後、2mlの培養液をベンゼン2mMを唯一の炭素源として含む200mlのM9液体培地中に加え、30°Cで培養した。培養中、18時間後、28時間後、38時間後、48時間後、58時間後、68時間後にベンゼンを培地中の濃度として2mMになるように追加し、78時間後に遠心分離によって菌体を集菌した。この時、培地中のベンゼン濃度をガスクロマトグラフィーによって測定したところ、10μM以下であった。

【0042】集菌したTL2株のペレットを凍結乾燥したところ、192mgであった。この凍結乾燥ペレットから、実施例1と同様の方法でポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、89mgであった。乾燥菌体当たりの量比は約46%ということになる。

【0043】得られたポリマーの組成を、実施例1と同様の方法で分析したところ、3HBが95%、4HBが5%のポリエステルであることが判明した。更に、GPCによってその分子量を測定したところ、数平均分子量(Mn)が30000、重量平均分子量(Mw)が1000000であった。

【0044】実施例7 (TL2株を用いたキシレンによるPHBの生産)

酵母エキス0.2%を含むM9寒天培地上のTL2株のコロニーを、酵母エキス0.1%、キシレン2mMを含むM9液体培地に植菌し、30°Cで培養した。30時間後、2mlの培養液をキ

シレン2mMを唯一の炭素源として含む200mlのM9液体培地中に加え、30°Cで培養した。培養中、24時間後、34時間後、44時間後、54時間後、64時間後、74時間後にベンゼンを培地中の濃度として2mMになるように追加し、84時間後に遠心分離によって菌体を集菌した。この時、培地中のキシレン濃度をガスクロマトグラフィーによって測定したところ、10μM以下であった。

【0045】集菌したTL2のペレットを凍結乾燥したところ、186mgであった。この凍結乾燥ペレットから、実施例1と同様の方法でポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、81mgであった。乾燥菌体当たりの量比は約44%ということになる。

【0046】得られたポリマーの組成を、実施例1と同様の方法で分析したところ、3HBが93%、4HBが7%のポリエステルであることが判明した。更に、GPCによって分子量を測定したところ、数平均分子量(Mn)が280000、重量平均分子量(Mw)が980000であった。

【0047】実施例8 (TB64株を用いたエチルベンゼンによるPHBの生産)

酵母エキス0.2%を含むM9寒天培地上のTB64株のコロニーを、酵母エキス0.2%、エチルベンゼン1mMを含むM9液体培地に植菌し、密栓して30°Cで培養した。30時間後、2mlの培養液をエチルベンゼン2mMを唯一の炭素源として含む200mlのM9液体培地中に加え、密栓して30°Cで培養した。培養中、24時間後、34時間後に、培地中の濃度として1mM、40時間後、50時間後、60時間後、70時間後に培地中の濃度として2mMになるようにエチルベンゼンを追加し、85時間後に遠心分離によって菌体を集菌した。この時、培地中のエチルベンゼンの濃度をガスクロマトグラフィーによって測定したところ、10μM以下であった。

【0048】集菌したTB64のペレットを凍結乾燥したところ、179mgであった。この凍結乾燥ペレットから、実施例1と同様の方法でポリマーを得た。このポリマーを室温で減圧乾燥し、秤量したところ、73mgであった。乾燥菌体当たりの量比は約41%ということになる。

【0049】得られたポリマーの組成を、実施例1と同様の方法で分析したところ、3HBが96%、4HBが4%のポリエステルであることが判明した。また、3HVに相当するピークがトレースで確認された。更に、GPCによってその分子量を測定したところ、数平均分子量(Mn)が26000、重量平均分子量(Mw)が990000であった。

【0050】

【発明の効果】本発明の方法により、ベンゼン、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、フェノール、クレゾールといった芳香族化合物から、生物的にポリヒドロキシブチレートを中心とするポリヒドロキシアルカノエートを生産することが可能となった。